

Micropropagação de cultivares de framboeseira¹

Roberto Pedroso de Oliveira²
Antonio Fernando Pacheco Nino³
Carla Sigales de Vasconcelos⁴

Introdução

A framboeseira (*Rubus ideaus* L.) é uma espécie do grupo das pequenas frutas originária do Centro e do Norte da Europa e de parte da Ásia (RASEIRA et al., 2004), sendo considerada uma potencial alternativa de renda para as pequenas propriedades familiares das regiões de clima temperado (OLIVEIRA et al., 2006).

A produção de framboesa no Brasil é realizada principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (PAGOT, 2004). No Brasil, as cultivares Heritage, Autumn Bliss e Batum, encontram-se entre as mais plantadas. A 'Heritage' é a de maior distribuição mundial, desenvolve-se adequadamente em diferentes tipos de solo, no entanto exige mais de 600 horas anual de frio hibernal para frutificação (PAGOT e ILHA, 2007). A 'Autumn Bliss' produz frutos grandes, de formato oval-cônico, coloração vermelha-escura e sabor agradável, sendo de maturação mais precoce do que a 'Heritage' (RASEIRA et al., 2004). A 'Batum' é de baixa exigência em frio, produz frutos de coloração vermelha e formato oval, sendo indicada para regiões não tão frias (PAGOT e ILHA, 2007). A 'Dorman Red' é vigorosa e tolerante a altas temperaturas no verão, produzindo

frutos firmes, de coloração vermelha-brilhante e tamanho grande (RASEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

Há 16 anos, a Embrapa Clima Temperado vem aprimorando protocolo para a micropropagação de cultivares de framboeseira. Nesse período, milhares de mudas foram produzidas, sendo disponibilizadas a produtores de diferentes Estados. Porém, ainda não foi quantificado o comportamento das principais cultivares quanto ao seu potencial de micropropagação, o que é muito importante para a etapa de planejamento da produção nos laboratórios. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* das cultivares de framboeseira Autumn Bliss, Batum, Dorman Red e Heritage.

Metodologia

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, avaliando quatro cultivares de framboeseira: Autumn Bliss, Batum, Dorman Red e Heritage.

¹Trabalho de pesquisa realizado com apoio financeiro e bolsas da FAPERGS e do CNPq

²Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS. (rpedroso@cpact.embrapa.br)

³Técnico de laboratório da Embrapa Clima Temperado. Bolsista CNPq. (nino@cpact.embrapa.br)

⁴Graduanda em Ciências Biológicas. Universidade Católica de Pelotas, Rua Felix da Cunha, 412, 96010-000 Pelotas, RS. Bolsista CNPq. (carla_sigales@hotmail.com)

Ponteiros de ramos brotados no verão foram coletados de cada cultivar da Coleção de Pequenas Frutas da Embrapa Clima Temperado. A desinfestação foi realizada em soluções compostas por álcool 70%, durante 10-15 segundos, e hipoclorito de sódio a 1%, durante 10 minutos. Em seguida, foram lavados três vezes com água destilada e autoclavada, sob condições assépticas.

Em fevereiro de 2007, sessenta meristemas ($\pm 0,3$ mm) de cada cultivar foram isolados em câmara de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica. Em seguida, foram inoculados (Subcultivo 0), individualmente, em tubos de ensaio (15 mm x 150 mm) contendo 6 mL de meio semi-sólido composto pelos sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,1 mg L⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico). Após a adição de agar, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9. A autoclavagem foi realizada à temperatura de 121°C à 1,5 atm, por 15 minutos. Em seguida, os meristemas introduzidos *in vitro* foram conduzidos à sala de cultura com intensidade luminosa de 20 mE m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 \pm 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

Após 60 dias, foram escolhidos os explantes mais desenvolvidos de cada cultivar para dar seqüência ao processo de multiplicação. Estes foram transferidos para frascos de vidro (120 mm de altura x 50 mm de diâmetro) contendo 40 mL do meio de cultura MS suplementado com 0,8 mg L⁻¹ de BAP e 15 mg L⁻¹ sulfato de ferro, sendo inoculados com o tamanho de 3-5 mm, contendo de duas a quatro gemas (OLIVEIRA et al., 2006). O ajuste do pH, a autoclavagem e as condições de cultivo foram realizados da mesma forma relatada anteriormente. Desta maneira, foram conduzidos seis subcultivos de 40 dias, avaliando-se as taxas de multiplicação e de contaminação dos explantes, os níveis de oxidação e de vitrificação e o estado geral das plantas. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente ao acaso, com dez repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco contendo cinco explantes. As taxas de multiplicação das cultivares, nos subcultivos 3 a 6, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, mediante prévia transformação dos dados para $(x+0,5)^{1/2}$. A estimativa do número de plantas obtidas de cada cultivar

foi realizada multiplicando-se as taxas de multiplicação obtidas nos seis subcultivos e considerando-se a eficiência da aclimatização.

O enraizamento das plantas foi realizado *in vitro*, utilizando meio de cultura semi-sólido MS com metade da concentração dos sais e 0,1 mg L⁻¹ ANA. Para esta fase, foram utilizadas todas as plantas maiores que 6 mm, as quais foram individualizadas. Após 30 dias, as plantas que se desenvolveram foram transplantadas em bandejas de isopor de 72 células, contendo substrato comercial Plantmax HT⁰. As bandejas foram dispostas em túnel plástico no interior de casa-de-vegetação com controle de temperatura (25-30°C) e de irrigação. Gradativamente, ao longo de 15 dias, a cobertura plástica foi sendo removida, até completar a aclimatização (OLIVEIRA et al., 2006).

Resultados e Discussão

Na fase de estabelecimento *in vitro* (Subcultivo 0), as cultivares Autumn Bliss e Heritage apresentaram as maiores porcentagens de meristemas desenvolvidos, respectivamente de 97% e 84%. As menores foram obtidas com as cultivares Dorman Red (56%) e Batum (36%). Como o material vegetal foi coletado de plantas cultivadas a campo e não em casa-de-vegetação, a porcentagem de desenvolvimento dos meristemas, com média de 68%, pode ser considerada satisfatória.

Independentemente da cultivar, a taxa média de multiplicação foi de 4,6 plantas por subcultivo (Tabela 1). Este resultado evidencia o adequado ajuste do meio e das condições de cultura e a facilidade da micropropagação da framboeseira.

Nesse estudo, verificou-se efeito pronunciado da cultivar no desenvolvimento *in vitro* das plantas (Tabela 1). As taxas médias de multiplicação por subcultivo foram de 6,4 para 'Autumn Bliss', 4,7 para 'Heritage', 4,1 para 'Batum' e 3,0 para 'Dorman Red'. Esse efeito do genótipo na taxa de multiplicação *in vitro* já havia sido descrito na espécie *Rubus ideaus* por Mezzetti et al. (2004).

Destacadamente, a cultivar Autumn Bliss apresentou o maior potencial de multiplicação *in vitro*, estimando-se a obtenção de 56.664

mudas por meristema inicial responsivo, após seis subcultivos de 40 dias (Figura 1). Isto também ficou evidenciado pelos resultados do teste de Tukey a 5% de probabilidade, ao se comparar as taxas médias de multiplicação das cultivares nos subcultivos 3 a 6 (Tabela 1).

Após a cultivar Autumn Bliss, a 'Heritage' apresentou o maior potencial de multiplicação

in vitro, equívulendo-se à 'Batum' em alguns dos subcultivos. A cv. Dorman Red apresentou a menor taxa média de multiplicação (3,0), embora esta seja elevada ao se comparar com outras espécies frutíferas (OLIVEIRA e SILVA, 1997). Observou-se que a 'Dorman Red' concentra a energia obtida do meio de cultura na formação de folhas grandes ao invés de na formação de novos brotos.

Tabela 1. Taxa média de multiplicação por subcultivo de cultivares de framboeseira (*Rubus ideaus* L.) durante a micropropagação.

Cultivar	Subcultivo						Taxa média multiplicação
	1	2	3	4	5	6	
Autumn Bliss	3,5	7,0	7,5 aA	6,5 aA	6,7 aA	7,3 aA	6,4
Batum	1,0	3,1	5,3 bA	5,3 bA	5,0 bA	4,6 bA	4,1
Dorman Red	3,4	2,8	2,8 cA	2,9 cA	3,2 cA	2,9 cA	3,0
Heritage	1,8	5,5	5,1 bA	5,6 bA	4,0 cB	6,1 aA	4,7
Média	2,4	4,6	5,2	5,1	4,7	5,2	4,6
CV (%)	22,4	19,9	5,9	8,1	7,8	7,9	-

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na análise estatística, os valores foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$.

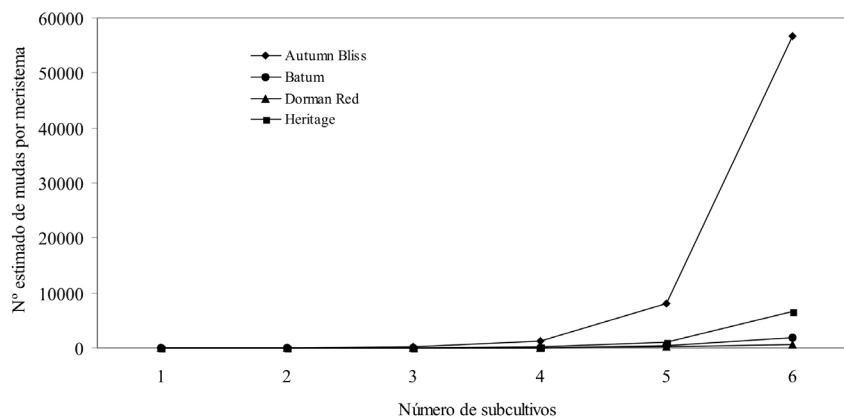


Figura 1. Número estimado de mudas de quatro cultivares de framboeseira (*Rubus ideaus* L.), micropropagadas ao longo de seis subcultivos.

Durante o cultivo, as plantas estudadas não apresentaram formação de calos, o que é importante para evitar a ocorrência de variação somaclonal. No presente trabalho, mudas atípicas não foram observadas nas condições *in vitro* e de casa-de-vegetação, o que pode ser atribuído à realização de apenas seis subcultivos de 40 dias durante a fase de multiplicação e à utilização de doses baixas de reguladores de crescimento (EPPO, 2004).

Na fase de multiplicação (subcultivos 1 a 6), não houve contaminação, vitrificação e oxidação dos explantes das quatro cultivares estudadas (Tabela 2), revelando condições adequadas de cultivo *in vitro* e de manipulação dos explantes. Ainda na Tabela 2, verifica-se que, somente na fase de estabelecimento *in vitro*, independentemente

da cultivar, houve contaminação (5%) e oxidação (43%) dos explantes, o que era esperado em função de terem sido coletados do campo e da adaptação das cultivares às condições *in vitro*.

Neste trabalho, praticamente 100% das plantas submetidas ao enraizamento *in vitro* apresentaram desenvolvimento satisfatório de raízes.

A eficiência do processo de aclimatização das plantas foi em torno de 97%, sem haver variação entre as cultivares. As mudas apresentaram crescimento vigoroso em casa-de-vegetação, evidenciando a eficiência do sistema utilizado para alongamento, enraizamento, pegamento e desenvolvimento das mudas.

Tabela 2. Porcentagem de explantes por subcultivo (SC) de cultivares de framboeseira (*Rubus ideaus* L.) contaminados por fungos e/ou bactérias (C), com sintomas de vitrificação (V) e de oxidação (O) durante a micropropagação.

Cultivar	SC 0			SC 1			SC 2			SC 3			SC 4			SC 5			SC 6			Média					
	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O			
Autumn Bliss	5	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Batum	5	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	11
Dorman Red	5	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9
Heritage	5	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
Média	5	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6

Conclusões

1. As cultivares de framboeseira apresentam pronunciada variabilidade genética quanto ao potencial de multiplicação *in vitro*.
2. A cultivar Autumn Bliss apresenta o maior potencial de multiplicação *in vitro*, seguida por 'Heritage', 'Batum' e 'Dorman Red'.
3. O sistema de micropropagação avaliado proporciona taxas satisfatórias de multiplicação para quatro cultivares de framboeseira, com níveis mínimos de contaminação, vitrificação e oxidação das plantas.

Referências

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Certification schemes; pathogen-tested material of *Rubus*. Paris: EPPO, 2004. 9 p.

MEZZETTI, B.; SAVINI, G.; CARNEVALI, F.; MOTT, D. Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biologia Plantarum*, Prague, v. 39, n. 1, p. 139-150, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco

tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, R.P.; SILVA, S.O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R.P.; RASEIRA, M.C.B.; NICKEL, O.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. Produção de mudas certificadas de framboeseira por meio de cultura *in vitro* de tecidos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 42 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 9).

PAGOT, E. Diagnóstico da produção e comercialização de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., 2004, Vacaria. Anais ... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 9-18. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 44).

PAGOT, E.; ILHA, L. Cultivo da framboesa. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 4., 2007, Vacaria. Anais ... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 53-55. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 59).

RASEIRA, M.C.B.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C. Aspectos técnicos da cultura da framboeseira. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 22 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 120).

Comunicado Técnico, 182

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Clima Temperado
Endereço: Caixa Postal 403
Fone/fax: (53) 3275-8199
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão 2008: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: *Walkyria Bueno Scivittaro*
Secretário-Executivo: *Joseane M. Lopes Garcia*
Membros: *Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Vernetti Azambuja, Luís Antônio Suíta de Castro. Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes*

Expediente

Revisão de texto: *Sadi Sapper*
Normalização bibliográfica: *Regina das Graças Vasconcelos dos Santos*
Editoração eletrônica: *Oscar Castro*
Composição e Impressão: Embrapa Clima Temperado